

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : 2 829 940

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 01 12442

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 47/48, A 61 K 39/395, 47/42, A 61 P 25/00,  
G 01 N 33/531, C 07 K 19/00

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 27.09.01.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 28.03.03 Bulletin 03/13.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SYNT:EM Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : TEMSAMANI JAMAL, ROUSSELE  
CHRISTOPHE et REES ANTHONY R.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ SIMONNOT.

⑤4 COMPOSITIONS POUR LA VECTORISATION D'ANTICORPS A TRAVERS LA BARRIERE  
HEMATOENCEPHALIQUE ET LEUR UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC OU LE TRAITEMENT DES  
MALADIES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.

⑤7 La présente invention a pour objet un composé consti-  
tué d'au moins un anticorps ou fragment d'anticorps lié à  
au moins un peptide vecteur capable de permettre son  
transport à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE).  
L'invention concerne aussi la préparation de ces composés  
et les compositions pharmaceutiques les contenant, utiles  
pour le diagnostic ou le traitement des maladies du système  
nerveux central.

FR 2 829 940 - A1



COMPOSITIONS POUR LA VECTORISATION D'ANTICORPS  
A TRAVERS LA BARRIERE HEMATOENCEPHALIQUE ET LEUR  
UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC OU LE TRAITEMENT DES  
MALADIES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.

5

10

15

La présente invention se rapporte au transport d'anticorps ou de fragments d'anticorps à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ainsi, l'invention a pour objet un composé constitué d'au moins un anticorps ou fragment d'anticorps lié à au moins un peptide vecteur capable de permettre le transport à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) dudit anticorps ou fragment. L'invention concerne aussi la préparation de ces composés et les compositions pharmaceutiques les comprenant utiles pour le diagnostic ou le traitement des maladies du système nerveux central.

20

25

Les maladies du système nerveux central (maladies neurodégénératives, cancers du cerveau, etc.) représentent un problème de santé majeur. Dans la plupart de ces maladies, un diagnostic précoce de la maladie permettrait de traiter efficacement la maladie et même dans certains cas de la prévenir. Malheureusement pour certaines maladies neurodégénératives, comme le cas de l'Alzheimer par exemple, le diagnostic ne peut se faire que *postmortem*. Or, on sait que cette maladie est due à une déposition à long-terme de l'amyloïde dans le cerveau. Une détection précoce de cette déposition, par des agents tels que les anticorps, permettrait de traiter plus rapidement et efficacement la maladie.

30

Les anticorps, en général, et spécialement les anticorps monoclonaux sont très largement utilisés dans le diagnostic pour détecter un antigène spécifique. Cependant, l'utilisation des anticorps dans le traitement ou le diagnostic des maladies du système nerveux central est très

limitée car ces anticorps ne passent pas la barrière hémato-encéphalique.

La barrière hémato-encéphalique est constituée par des cellules endothéliales qui font obstacle, de diverses manières, aux molécules qui tentent de les franchir: d'une part, elles constituent une barrière physique représentée par les jonctions étanches qui relient entre elles et empêchent tout passage par la voie paracellulaire et ce, d'autant plus que l'activité d'endocytose y est faible. Tout ceci limite fortement le passage des molécules du plasma vers l'espace extracellulaire cérébral. Généralement, la barrière hémato-encéphalique laisse passer des molécules de faible poids moléculaire (< 600d) et qui sont lipophiles. Toutes les autres molécules, tels que les anticorps, seront retenues par la barrière et ne pourront pas accéder au cerveau.

L'augmentation du passage des anticorps à travers la barrière hémato-encéphalique permet un diagnostic efficace d'une maladie du système nerveux central la maladie. Par exemple, un anticorps qui reconnaît un peptide spécifique de la maladie d'Alzheimer peut être injecté à un patient avec un traceur radioactif. L'anticorps traverse la barrière, grâce à un vecteur, et rentre dans le cerveau pour se lier au peptide Alzheimer. La liaison entre l'anticorps et le peptide Alzheimer peut ensuite être détectée par des méthodes conventionnelles de neuroimagerie.

La Demanderesse a mis en évidence que des vecteurs peptidiques linéaires, tels que les peptides linéaires dérivés de peptides naturels comme la Protégrine et la Tachyplésine transportent des molécules actives à travers la BHE et améliorent les propriétés pharmacologiques de ces molécules. Les travaux et résultats concernant ces peptides linéaires et leur utilisation comme

vecteurs de molécules actives à travers la barrière hémato-encéphalique ont été décrits dans les demandes de brevet français N° 98/15074 déposée le 30 Novembre 1998 et dans la demande de brevet français N° 99/02938 déposée le 26

5

La présente invention a donc pour objet des composés constitués d'au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps lié à au moins un peptide linéaire capable de vectoriser ledit anticorps ou fragment à travers la

10

Un premier groupe de peptides linéaires mis en œuvre dans le cadre des composés de l'invention sont ceux comprenant un domaine de transduction. On entend par domaine de transduction, une séquence peptidique capable de pénétrer à l'intérieur des cellules. A titre d'exemples de domaines de transduction, et de manière non-limitative, on peut citer :

15

- Les peptides dérivés de la protéine Tat de HIV1 [Fawell et al, Proc. Natl. Acad. Sci 91 ; 664 (1994) ; Schwarze et al, Science 285 ; 1569 (1999)]. Il s'agit par exemple du fragment 48-60 de la protéine tat de séquence SEQ ID NO:1 : GRKKRRQRRPPQ, ou d'un fragment comprenant cette séquence comme le fragment 37-72.

20

- La pénétratine [Derossi et al, J. Biol. Chem 269, 10444 (1994) ; Brevet US 5888762)], de séquence SEQ ID NO:2: RQIKIWFQNRRMKWKK

25

- Les séquences signales, ou séquences de translocation membranaires (MTSS) de peptides. Celles-ci sont reconnues par un accepteur de protéines qui participe à l'adressage de la pré-protéine depuis la machinerie de traduction jusque dans la membrane de l'organelle intracellulaire approprié. Les MTSS qui dirigent les protéines dans le même compartiment intracellulaire, comme le reticulum endoplasmique (RE) ou les mitochondries partagent plusieurs caractères structuraux. Les MTS RE

30

35

contiennent 17 à 52 acides aminés organisés avec une section chargée positivement à l'extrémité N-terminale, un intersegment hydrophobe et une région C-terminale polaire avec des sites de reconnaissance de peptidase. On peut citer comme séquences signales celles de séquences SEQ ID NO:3 : GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV, ou de séquence SEQ ID NO:4 : AAVALLPAVLLALLAP.

Un second groupe de peptides linéaires selon l'invention sont dérivés de Protégrines et Tachyplésines. Les Protégrines et Tachyplésines sont des peptides antibiotiques naturels dont la structure est de type épingle à cheveux maintenue par des ponts disulfures. Ces ponts jouent un rôle important dans l'activité cytolytique observée sur cellules humaines.

On désigne sous le nom de protégrines un ensemble de cinq peptides désignés PG-1, PG-2, PG-3, PG-4 et PG-5 dont les séquences sont données ci-dessous, étroitement apparentés et isolés de leucocytes de porc (V.N. Kokryakov & col. FEBS lett. 327, 231-236) :

SEQ ID NO:5 : PG-1 : RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>  
 SEQ ID NO:6 : PG-2 : RGGRLCYCRRRFCICV...-NH<sub>2</sub>  
 SEQ ID NO:7 : PG-3 : RGGGLCYCRRRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>  
 SEQ ID NO:8 : PG-4 : RGGRLCYCRGWICFCVGR-NH<sub>2</sub>  
 SEQ ID NO:9 : PG-5 : RGGRLCYCRPRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>

Les tachyplésines (Tamura, H. et al., 1993, Chem. Pharm. Bul. Tokyo 41, 978-980), désignées T1, T2 et T3 et les polyphémusines (Muta, T., 1994, CIBA Found. Sym. 186, 160-174), désignées P1 et P2, dont les séquences sont données ci-dessous, sont des peptides homologues isolés de l'hémolymphe de deux crabes, *Tachyplesus tridentatus* pour les tachyplésines T1, T2 et T3 et *Limulus polyphemus* pour les polyphémusines P1 et P2 :

SEQ ID NO:10 : P1 : RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH<sub>2</sub>  
 SEQ ID NO:11 : P2 : RRWCFRVCYKGFYRKCR-NH<sub>2</sub>

Protégrines, tachyplésines et polyphémusines contiennent une forte proportion de résidus basiques

(lysines et arginines) et possèdent quatre cystéines qui forment deux ponts disulfures parallèles. Ces trois familles de peptides présentent également des homologues avec certaines défensines et en particulier avec la défensine humaine NP-1 (Kokryakov, V. N. et al., 1993, Febs Let. 327, 231-236).

L'invention a donc pour objet un composé constitué d'au moins un anticorps ou fragment d'anticorps lié à au moins un peptide linéaire choisi dans le groupe comprenant :

- un peptide linéaire dérivé de protégrines ou de tachyplésines,

- un peptide linéaire comprenant un domaine de transduction.

L'invention envisage tout particulièrement comme peptides linéaires comprenant un peptide transduction choisi, de manière non-limitative, parmi :

- les domaines de transduction dérivés de la protéine Tat de HIV1

- les domaines de transduction dérivés de la troisième hélice d'Antennapedia

- les domaines de transduction d'une séquence signal

L'invention envisage tout particulièrement comme peptides linéaires dérivés de Protégrines, un peptide qui répond à la formule (I) suivante :

BX(X ou B)BXXXXBBBXXXXXXB (I)

et par peptide linéaire dérivé de Tachyplésines, un peptide qui répond à la formule (II) suivante :

BXXXBXXXBXXXXBBXB (II),

dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique

ou lesdits peptides de formules (I) ou (II), sous forme rétro, constitués d'acides aminés de configuration D et/ou L,

ou un fragment de ceux-ci constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs des peptides de formules (I) ou (II).

On peut citer comme exemple, les significations de B et X suivantes :

B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

X est choisi parmi glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine<sup>Acm</sup>, la penicillamine, la méthionine, le serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la bêta-cyclohexylalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la bêta-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1-naphtylalanine, la 2-naphtylalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridylalanine, la [2-thiényl]alanine.

A titre d'exemple de molécules d'anticorps dans les composés de l'invention, on peut citer les anticorps polyclonaux, les anticorps monoclonaux, et leurs fragments.

La liaison entre l'anticorps ou fragment d'anticorps et le peptide linéaire dans les composés de

l'invention est choisie parmi une liaison covalente, une liaison hydrophobe, une liaison ionique, une liaison clivable ou une liaison non clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur des cellules.

5

Cette liaison peut être directe ou indirecte par l'intermédiaire d'un bras de liaison (linker) et effectuée au moyen d'un groupe fonctionnel naturellement présent ou introduit soit sur le peptide, soit sur l'anticorps ou le fragment d'anticorps, soit sur les deux.

10

Ce bras de liaison s'il est présent doit être acceptable compte tenu de la nature chimique et de l'encombrement tant du peptide que de l'anticorps ou du fragment. On peut citer à titre d'exemple de tels linkers contenant des groupements alkyle, aryle, aralkyle ou peptidique, des esters, 15 aldéhydes ou acides d'alkyle, aryle ou aralkyle, des groupements anhydrides, sulfhydriles, ou carboxyles tels que les dérivés de l'acide maleymil benzoïque, de l'acide maleymil propionique et des dérivés succynimidyle, des groupes dérivés du bromure ou chlorure de cyanogène, 20 carbonyldiimidazole, des esters de succinimide ou des halogénures sulphoniques.

Comme groupes fonctionnels, on peut citer : -OH, -SH, -COOH, ou -NH<sub>2</sub>. Ainsi, le ou les dérivés anticorps ou fragments peuvent être liés par des liaisons 25 covalentes au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des chaînes latérales du peptide.

Un type de liaison préféré entre le ou les anticorps ou fragments d'anticorps et le ou les peptides 30 linéaires implique au moins un pont disulfure. En effet, ce type de liaison se caractérise par sa stabilité dans le plasma après injection du composé, puis une fois que les composés de l'invention ont traversé la barrière hémato-encéphalique, ledit pont disulfure est réduit en libérant 35 l'anticorps ou le fragment d'anticorps. La liaison peut



être effectuée en n'importe quel site du peptide comme indiqué précédemment.

Selon, une forme particulière de réalisation, les composés de l'invention sont des protéines de fusions, obtenues à l'aide d'une molécule d'acide nucléique recombinante comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour l'anticorps ou fragment d'anticorps et au moins une séquence nucléotidique codant pour un peptide linéaire. L'invention concerne donc également une telle molécule d'acide nucléique, qui peut comprendre en outre des séquences de contrôle et/ou insérée dans des vecteurs. Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré. Il peut s'agir de tout vecteur comme un plasmide.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique pour le diagnostic ou le traitement des maladies du système nerveux central comprenant à titre d'agent actif au moins un composé décrit précédemment.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont utiles pour le diagnostic ou le traitement des maladies du système nerveux central comme par exemple, de manière non-limitative, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les tumeurs cérébrales ou encore des infections du cerveau par le virus HIV, etc.

Les anticorps ou fragments d'anticorps mis en œuvre dans les composés selon l'invention peuvent être utilisés en diagnostic en utilisant une seule administration ou en traitement en utilisant des injections uniques ou répétées. Par exemple, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'utilisation d'un anticorps monoclonal reconnaissant un peptide amyloïde permet de diagnostiquer la maladie. De même, un anticorps contre une protéine virale du HIV-1 (gp41, p24, gp120, etc.) permet le

diagnostic de l'infection dans le système nerveux central. Le blocage de la protéine virale permet également de neutraliser la particule virale et par conséquent de stopper la réplication virale.

De préférence, ladite composition pharmaceutique se présente sous une forme appropriée pour une administration par voie parentérale, par voie orale, par voie rectale, par voie nasale, par voie transdermique, par voie pulmonaire, par voie centrale.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'un peptide linéaire défini précédemment pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au diagnostic, au traitement et/ou à la prévention des maladies du système nerveux central, ledit peptide étant lié à au moins un anticorps ou fragment d'anticorps pour vectoriser celui-ci à travers la BHE.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent concernant la préparation d'un composé constitué d'un anticorps anti-biotine et d'un peptide linéaire et son activité. Il sera fait référence aux dessins en annexe dans lesquels :

- la figure 1 représente schématiquement anticorps anti-biotine couplé à un peptide via la biotine.

- la figure 2 les résultats d'une étude comparative de l'efficacité de passage à travers la barrière hémato-encéphalique entre l'anticorps anti-biotine libre (composé 1) et l'anticorps vectorisé (composé 2).

#### I - Conditions expérimentales.

##### 1) Synthèse Chimique du peptide biotinylé.

Le peptide vecteur est synthétisé en phase solide et après incorporation de l'arginine N-terminale on

ajoute l'acide 5-aminopentanoïque. Le Fmoc ou le Boc N-terminal est enlevé et on fait réagir sur le peptide toujours accroché à la résine le N-hydroxy succimido ester de la biotine dans le diméthylformamide. Après 15 heures de réaction à température ambiante, le peptide biotinylé est coupé du support par réaction de l'acide trifluoroacétique ou de l'acide fluorhydrique selon des protocoles bien établis dans la chimie des peptides. Le peptide est ensuite purifié par chromatographie liquide à haute pression.

Le peptide SynB1 de séquence SEQ ID NO:12 : RGGRLSYSRRRFSTSTGR, est assemblé sur phase solide selon une stratégie Fmoc/tu, clivé et déprotégé par l'acide trifluoroacétique, puis purifié par chromatographie haute pression préparative en phase inverse et lyophilisé. Sa pureté (>95%) et son identité sont confirmées par HPLC analytique et par spectrométrie de masse.

#### 2) Perfusion Cérébrale in situ.

Des souris (20-25 g, Iffa-Credo ; l'Arbresle, France) sont anesthésiées. Après exposition de la carotide commune, l'artère carotide externe droite est liée au niveau de la bifurcation avec la carotide interne et la carotide commune est liée entre le cœur et le site d'implantation du cathéter (cathéter polyéthylène, ID :0.76). Celui-ci, préalablement rempli par une solution d'héparine (100 unités/ml) est inséré dans la carotide commune. Les souris sont perfusées avec le tampon de perfusion (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.2 mM KCl, 2.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgSO<sub>4</sub>, et 9 mM D-glucose). Ce tampon est filtré puis bullé par un mélange contenant 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> afin de maintenir le pH proche de 7.4 et d'alimenter le cerveau en oxygène au cours de la perfusion.

Les souris sont perfusées avec le tampon contenant l'anticorps anti-biotine libre ou l'anticorps vectorisé. L'anticorps étant marqué à l'Iode 125. Juste avant le début de la perfusion, le cœur est arrêté par

section des ventricules, ceci afin d'éviter au cours de la perfusion un reflux du perfusat. L'hémisphère droit est alors perfusé à une vitesse de 10 ml/min pendant 60 secondes après quoi la souris est décapitée. La quantité de radioactivité dans l'hémisphère droit est alors mesurée et la pénétration cérébrale (Kin) est calculée.

## II - Composés testés.

Les composés testés sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Composé	
Composé 1	IgG antibiotine
Composé 2	IgG Antibiotine -Biot-SynB1

## III - Résultats.

Dans cette étude, nous avons comparé la pénétration dans la BHE de l'anticorps libre avec l'anticorps vectorisé. Nous avons choisi un anticorps anti-biotine car il peut se fixer directement sur un peptide biotinylé. Pour cela, nous avons donc synthétisé un peptide SynB1 biotinylé et nous l'avons incubé avec l'anticorps anti-biotine. Pour suivre le passage des produits à travers la barrière hémato-encéphalique, nous avons marqué préalablement l'anticorps à l'Iode 125 et purifié pour éliminer l'Iode libre.

L'anticorps libre et l'anticorps vectorisé sont ensuite perfusés dans le cerveau de la souris. Après 60 secondes de perfusion dans le tampon, la pénétration des produits est estimée par la constante d'influx ou Kin en ul/sec/g. Figure 2 montre que la vectorisation de l'anticorps par le vecteur SynB1 augmente son passage dans le cerveau d'environ 5 fois après une perfusion de 60 secondes dans du tampon.

## REVENDICATIONS

1) Un composé constitué d'au moins un anticrops  
ou fragment d'anticorps lié à au moins un peptide linéaire  
choisi dans le groupe comprenant :

- un peptide linéaire dérivé de protégrines ou  
de tachyplésines,

- un peptide linéaire comprenant un domaine de  
transduction.

2) Un composé selon la revendication 1,  
caractérisé en ce que le peptide linéaire est un dérivé de  
de protégrines ou de tachyplésines choisi parmi ceux de  
formules (I) ou (II) suivantes :

BX(X ou B)BXXXXBBBXXXXXXB (I)

BXXXBXXXBXXXBBXB (II),

dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents,  
représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne  
latérale porte un groupement basique, et

- les groupes X, identiques ou différents,  
représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou  
aromatique

ou lesdits peptides de formules (I) ou (II),  
sous forme rétro, constitués d'acides aminés de  
configuration D et/ou L,

ou un fragment de ceux-ci constitué d'une  
séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides  
aminés successifs des peptides de formules (I) ou (II).

3) Un composé selon la revendication 2,  
caractérisé en ce que dans les formules (I) et (II), B et X  
ont les significations suivantes :

B est choisi parmi l'arginine, la lysine, l'acide diaminoacétique, l'acide diaminobutyrique, l'acide diaminopropionique, l'ornithine.

5 X est choisi parmi glycine, l'alanine, la valine, la norleucine, l'isoleucine, la leucine, la cystéine, la cystéine<sup>Acm</sup>, la penicillamine, la méthionine, le serine, la thréonine, l'asparagine, la glutamine, la phénylalanine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la proline, l'Abu, l'acide amino-1-cyclohexane carboxylique, 10 l'Aib, la 2-aminotétraline carboxylique, la 4-bromophénylalanine, tert-Leucine, la 4-chlorophénylalanine, la bêta-cyclohexyalanine, la 3,4-dichlorophénylalanine, la 4-fluorophénylalanine, l'homoleucine, la bêta-homoleucine, l'homophénylalanine, la 4-méthylphénylalanine, la 1- 15 naphtyalanine, la 2-naphtyalanine, la 4-nitrophénylalanine, la 3-nitrotyrosine, la norvaline, la phénylglycine, la 3-pyridyalanine, la [2-thiényl]alanine.

20 4) Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le peptide linéaire comprend un domaine de transduction choisi dans le groupe comprenant:

- les domaines de transduction dérivés de la protéine Tat de HIV1,
- les domaines de transduction dérivés de la 25 troisième hélice d'Antennapedia,
- les domaines de transduction d'une séquence signal.

30 5) Un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'anticorps est choisi dans le groupe comprenant un anticorps polyclonal, un anticorps monoclonal ou des fragments de ceux-ci.

35 6) Un composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la

liaison entre l'anticorps ou le fragment d'anticorps et le peptide linéaire est choisie parmi une liaison covalente, une liaison hydrophobe, une liaison ionique, une liaison clivable ou une liaison non clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur des cellules.

7) Un composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la liaison entre l'anticorps ou le fragment d'anticorps et le peptide linéaire est une liaison directe ou indirecte par l'intermédiaire d'un bras de liaison.

8) Un composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la liaison entre l'anticorps ou le fragment d'anticorps et le peptide linéaire est réalisée au moyen d'un groupe fonctionnel naturellement présent ou introduit soit sur le peptide, soit sur l'anticorps ou le fragment d'anticorps, soit sur les deux.

9) Un composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'anticorps ou le fragment d'anticorps est lié par une liaisons covalentes au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des chaînes latérales du ou des peptides.

10) Un composé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'une protéine de fusion.

11) Une molécule d'acide nucléique pour l'expression d'un composé selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique codant pour un anticorps ou fragment

d'anticorps et au moins une séquence nucléotidique codant pour un peptide linéaire.

5 12) Une composition pharmaceutique pour le diagnostic ou le traitement des maladies du système nerveux central comprenant à titre d'agent actif à moins un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

10 13) Utilisation d'un peptide linéaire comme défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour le diagnostic ou le traitement des maladies du système nerveux central, ledit peptide étant lié à au moins un anticorps ou fragment d'anticorps pour  
15 vectoriser celui-ci à travers la BHE.



Figure 1

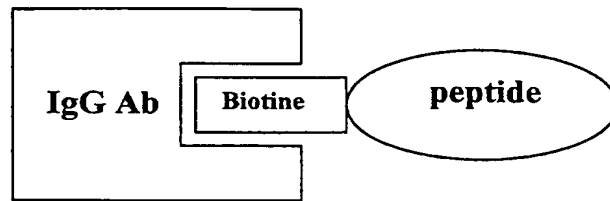
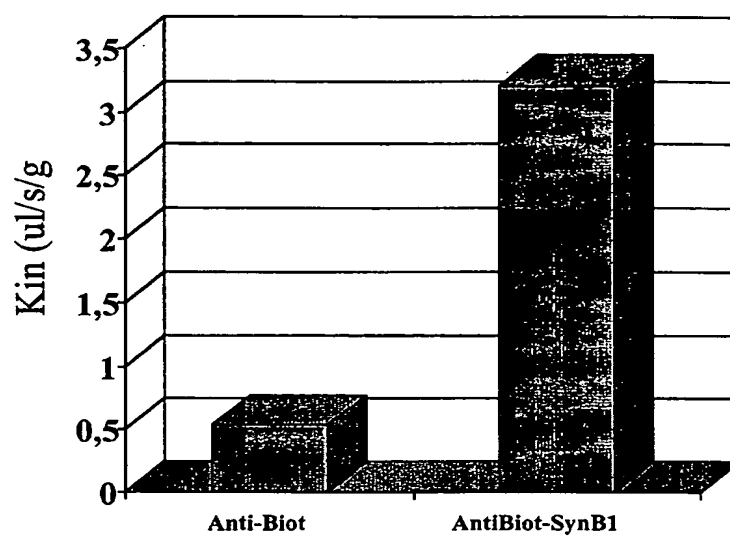


Figure 2



## SEQUENCE LISTING

<110> SYNT:EM SA

<120> Compositions pour la vectorisation d'anticorps à travers la barrière hématoencéphalique et leur utilisation pour le diagnostic ou le traitement des maladies du système nerveux central

<130> 15824FR

<140> FR 01/XXXXX

<141> 2001-09-27

<160> 12

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(12)

<223> Fragment 48-60 de la protéine Tat de HIV1

<400> 1

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro  
1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(16)

<223> Séquence de la Pénétratine

<400> 2

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> unidentified

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(27)

<223> Chimère du domaine terminal hydrophobe de la protéine virale gp41 et du signal de localisation nucléaire de l'antigène de SV40

<400> 3

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly  
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
20 25

2829940

<210> 4  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> unidentified  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(16)  
 <223> Dérivé des régions hydrophobes des séquences signal de K-FGF  
 <400> 4

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro  
 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Sus sp.  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(18)  
 <223> Protégrine PG-1  
 <400> 5

Arg Gly Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Arg Arg Arg Phe Cys Val Cys Val  
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 6  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Sus sp.  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(16)  
 <223> Protégrine PG-2  
 <400> 6

Arg Gly Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Arg Arg Arg Phe Cys Ile Cys Val  
 1 5 10 15

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Sus sp.  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(18)  
 <223> Protégrine PG-3  
 <400> 7

Arg Gly Gly Gly Leu Cys Tyr Cys Arg Arg Arg Phe Cys Val Cys Val  
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> PRT

2829940

<213> Sus sp.  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(18)  
 <223> Protégrine PG-4  
 <400> 8

Arg Gly Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Arg Gly Trp Ile Cys Phe Cys Val  
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 9  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Sus sp.  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(18)  
 <223> Protégrine PG-5  
 <400> 9

Arg Gly Gly Arg Leu Cys Tyr Cys Arg Pro Arg Phe Cys Val Cys Val  
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 10  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Limulus polyphemus  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(18)  
 <223> Polyphémusine P1  
 <400> 10

Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val Cys Tyr Arg Gly Phe Cys Tyr Arg Lys  
 1 5 10 15

Cys Arg

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Limulus polyphemus  
 <220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (1)..(18)  
 <223> Polyphémusine P2  
 <400> 11

Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val Cys Tyr Lys Gly Phe Cys Tyr Arg Lys  
 1 5 10 15

Cys Arg

<210> 12  
 <211> 18

2829940

<212> PRT  
<213> unidentified  
<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (1)..(18)  
<223> SynB1  
<400> 12

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr  
1 5 10 15

Gly Arg



2829940

# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 610582  
FR 0112442

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 01 13957 A (CELLGATE INC. ) 1 mars 2001 (2001-03-01) * le document en entier *	1-13	C07K19/00 A61K39/395 A61K47/42 A61K47/48 A61P25/00 G01N33/531
A	WO 00 62067 A (WASHINGTON UNIVERSITY) 19 octobre 2000 (2000-10-19) * le document en entier *	1-13	
A,D	WO 00 32236 A (SYNT:EM SA) 8 juin 2000 (2000-06-08) * le document en entier *	1-13	
A,D	WO 99 07728 A (SYNT:EM SA) 18 février 1999 (1999-02-18) * le document en entier *	1-13	
A	WO 97 12912 A (CNRS) 10 avril 1997 (1997-04-10) * le document en entier *	1-13	
E	WO 02 02595 A (SYNT:EM SA) 10 janvier 2002 (2002-01-10) *voir page 5, premier paragraphe, en combinaison avec page 15, dernier paragraphe*	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	S R SCHWARZE ET AL.: "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse" SCIENCE., vol. 285, 3 septembre 1999 (1999-09-03), pages 1569-1572, XP002204883 AAAS. LANCASTER, PA., US ISSN: 0036-8075 * le document en entier *	1-13	C12N A61K C07K
-/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 juillet 2002		Masturzo, P	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2829940

N° d'enregistrement  
national

FA 610582  
FR 0112442

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	D WU & W M PARDRIDGE: "Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 96, no. 1, janvier 1999 (1999-01), pages 254-259, XP002204884 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON., US ISSN: 0027-8424 * le document en entier *	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	S R SCHWARZE & S F DOWDY: "In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES., vol. 21, no. 2, février 2000 (2000-02), pages 45-48, XP004189118 ELSEVIER TRENDS JOURNAL, CAMBRIDGE., GB ISSN: 0165-6147 * le document en entier *	1-13	
A	DATABASE CA 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ROUSSELLE, CHRISTOPHE ET AL: "New advances in the transport of doxorubicin through the blood - brain barrier by a peptide vector-mediated strategy" retrieved from STN Database accession no. 133:79176 CA XP002204885 & MOLECULAR PHARMACOLOGY (2000), 57(4), 679-686 , 2000, * abrégé *	1-13	
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur	
8 juillet 2002		Masturzo, P	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			



2829940

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0112442 FA 610582**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 08-07-2002  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0113957 A	01-03-2001	AU 6939400 A	19-03-2001
		EP 1210121 A2	05-06-2002
		WO 0113957 A2	01-03-2001
WO 0062067 A	19-10-2000	AU 7497000 A	14-11-2000
		EP 1157275 A1	28-11-2001
		WO 0062067 A1	19-10-2000
WO 0032236 A	08-06-2000	FR 2786397 A1	02-06-2000
		AU 1391000 A	19-06-2000
		EP 1135168 A1	26-09-2001
		WO 0032236 A1	08-06-2000
WO 9907728 A	18-02-1999	FR 2767323 A1	19-02-1999
		AU 8988998 A	01-03-1999
		EP 1003771 A1	31-05-2000
		WO 9907728 A2	18-02-1999
		JP 2001512739 T	28-08-2001
WO 9712912 A	10-04-1997	FR 2739621 A1	11-04-1997
		EP 0797589 A1	01-10-1997
		WO 9712912 A1	10-04-1997
		JP 10510557 T	13-10-1998
		US 6080724 A	27-06-2000
WO 0202595 A	10-01-2002	FR 2810985 A1	04-01-2002
		AU 7261501 A	14-01-2002
		WO 0202595 A1	10-01-2002

EPO FORM P0485

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82